

DIE WIRKUNG VON ZYTOSTATIKA AUF DIE FUNKTION DER POLYPHENOLOXYDASE

von

P. BALOGH und V. FRENÝÓ

Pflanzenphysiologischer Lehrstuhl der Eötvös Loránd Universität, Budapest

Eingegangen: 30. September 1969

In den letzteren Jahren wandte man zahlreiche solche Verbindungen als Medikamente an, die sich bei der Behandlung der von bösartigen Geschwülsten verursachten Erkrankungen als wirksam erwiesen. Die bisherigen, vielversprechenden Ergebnisse eifern die Forscher zur Herstellung stets neuerer und neuerer Verbindungen an. Der Wirkungsmechanismus der bisher angewandten Präparate ist trotz der ausgedehnten Forschungsarbeit nicht in allen seinen Einzelheiten bekannt. Deshalb sind also all diese Versuche, die diese Wirkungsweise – eventuell dadurch, daß man ihr von verschiedenen Seiten her nähertritt – zu klären versuchen, zweifelsohne begründet.

Sowohl unsere bisherigen als auch die sich im Gange befindenden Versuche weisen mit den Mitteilungen anderer Forscher (Péterfi u. Mitarb. 1959, Sábél u. Mitarb. 1963, Maróti 1967) zusammen darauf hin, daß die in der humanen Heilkunde gebrauchten Zytostatika im allgemeinen auch die pflanzlichen Lebensprozesse beeinflussen. Dieses Faktum hat auch von praktischer Seite eine Bedeutung. Die Auswahl der eine zytostatische Wirkung zeigenden Verbindungen aus der Menge der zur Verfügung stehenden Verbindungen (screening) sowie die genaueren Reihenuntersuchungen (testing) sind sehr komplizierte Aufgaben, die viel Zeit, entsprechende Ausrüstung und ein gutes Fachpersonal beanspruchen (Sellei – Eckhardt – Németh 1968).

Durch die Sammlung einer entsprechenden Menge von Angaben wird eventuell bezüglich der Zytostatika die Ausarbeitung eines derartigen Untersuchungssystems möglich, das auch diese einfachen, raschen und demzufolge billigen Methoden verwerten kann.

Diese Untersuchungen können dazu als Modelle dienen, daß wir in der Kenntnis des – heutzutage noch zum guten Teil ungeklärten – humanen und tierischen Wirkungsmechanismus der Zytostatika einen Fortschritt machen können.

In unserer vorliegenden Abhandlung wünschen wir über jene Untersuchungen zu berichten, im Laufe derer wir – nach vorangehenden informativen Untersuchungen (Balogh – Frenýó 1967) – versucht haben, die durch pflanzliche Enzyme katalysierten Reaktionen mit gegen den Krebs angewand-

ten Zytostatika zu beeinflussen. Im Laufe der Untersuchungen erwies sich die Polyphenoloxydase, deren auf reine Substrate ausgeübte oxydierende Wirkung wir mit den untersuchten Zytostatika hemmten als sehr geeignet.

Material und Methode

Als Prinzip verfolgten wir folgendes Verfahren: es wurde Polyphenoloxydase in Pufferlösung mit verschiedenen Verdünnungen von Zytostatika vermengt. Als Substrat diente Tyrosin sowie Brenzkatechin. Das Gemisch kam in ein Wasserbad und die entstandene Farbenreaktion wurde auf Grund des Extinktionswertes mit dem Photometer gemessen.

Lösungen: 1. Wäßrige Lösung von Polyphenoloxydase. — Anfangs haben wir die Lösung aus Kartoffeln (nach dem etwas modifizierten Verfahren von K u b o w i t z) hergestellt, sodann im weiteren das im Handel erhältliche, in hohem Grade gereinigte Enzym benutzt (Fabrikation von Koch-Light bzw. Sigma). Die Stammlösung enthielt Enzyme von 10 E/ml.

2. Phosphatpuffer. — Das Tyrosin wurde in einem Puffer von pH 6,5, das Brenzkatechin in einem von pH 6,0 gelöst.

3. Tyrosin-Substrat. — Das Milliliter der Lösung enthielt 0,35 mg Tyrosin.

4. Brenzkatechin-Substrat. — Die Lösung enthielt 1,15 mg/ml.

5. Die untersuchten Zytostatika:

a) Wäßrige Lösung von 1,6-bis-(β Chloräthyl-Amino)-1,6-Desoxy-D-Mannit dihydrochloricum („Degranol“, verkürzt DG).

b) Wäßrige Lösung von 6-Mercaptopurin (verkürzt MP).

Die tyrosinhaltigen Mischungen wurden 50 Min., die brenzkatechinhaltigen 30 Min. lang in einem Wasserbad von 26°C gehalten. Die Intensität der entstandenen Farbenreaktion wurde gegen Wasser mit dem Spektromom-Photometer bei 480 μ m gemessen.

Ergebnisse und Besprechung

Zuerst vergleichen wir die hemmende Wirkung der zweierlei Zytostatika („DG“ und „MP“) auf die Polyphenoloxydase auf einem Brenzkatechinsubstrat auf der Tab. 1 und 2.

Tabelle 1.

Reaktionsgemisch = Brenzkatechin + Polyphenoloxydase + Zytostatikum

„DG“ mg/ml	0,0	0,1	0,5	1,0	2,0	3,0	4,0	5,0
Extinktion des Gemisches	0,450	0,445	0,380	0,340	0,320	0,290	0,260	0,245

Tabelle II.

Reaktionsgemisch = Brenzkatechin + Polyphenoloxydase + Zytostaticum

„MP“ mg/ml	0,0	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,8	1,0
Extinktion des Gemisches	0,450	0,345	0,300	0,250	0,150	0,100	0,060	0,040	0,020

Das zytostatische Substanzen nicht enthaltende Reaktionsgemisch zeigte nach 30 Min. einen Extinktionswert von 0,450. Dagegen wird das Reaktionsgemisch mit der zytostatischen Substanz weniger braun und beweist, daß die Wirkung der Polyphenoloxydase auf das Substrat vom Zytostatikum gehemmt wird. Die hemmende Wirkung des „MP“ war viel größer als die des „DG“.

Insofern diese Zytostatika das Enzym tatsächlich hemmen, so muß ihre Wirkung auch neben anderen Substraten eine ähnliche Tendenz zeigen. Diese Tatsache führen wir auf der Tab. 3 und 4. vor.

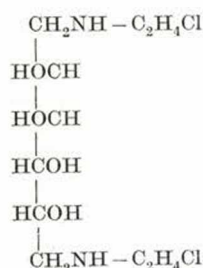
Tabelle IV.

Reaktionsgemisch = Tyrosin + Polyphenoloxydase + Zytostatikum

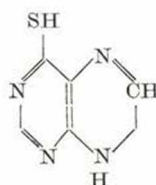
„MP“ mg/ml	0,00	0,01	0,02	0,03	u. s. w.
Extinktion des Gemisches	0,320	0,000	0,000	0,000	u. s. w.

Die Angaben beweisen, daß auch im Falle eines anderartigen Substrates die Wirkung der zweierlei Zytostatika die gleiche Tendenz aufweist, ja der Unterschied in der Intensität zwischen den beiden Zytostatika betreffs der Wirkung noch ausgeprägter erscheint! Das „MP“ hat sich, zumindest bezüglich der Polyphenoloxydase als ein viel stärkerer Enzyminhibitor erwiesen als das „DG“.

Die folgenden beiden Formeln zeigen, welche abweichende Struktur die angewandten zweierlei Zytostatika haben.



Degranol



Mercaptopurin

„DG“ mg/ml	Reaktionsgemisch				
	0,0	0,2	0,4	0,6	0,8
Extinktion des Gemisches	0,320	0,318	0,315	0,310	0,290

Auf Grund der abweichenden Zusammensetzung und der sehr unterschiedlichen Struktur der Formeln müssen wir voraussetzen, daß der Angriffspunkt der beiden Inhibitoren und ihr enzymhemmender Wirkungsmechanismus im Falle der Polyphenoloxydase nicht gleich ist. Unserer Ansicht nach ist auch die Folgerung zuläßig, wonach „DG“ und „MP“ als zytostatische Medikamente gleichfalls durch ihren abweichenden Mechanismus ihre Wirkung gegen den Krebs ausüben.

Die Erwägung dessen, ob die therapeutische Wirkung der zweierlei Medikamente mit der auf die Polyphenoloxydase ausgeübten inhibitorischen Wirkung proportionell sei, fällt außerhalb der Zielsetzung dieser Abhandlung.

Zusammenfassung

Es wurde im Zusammenhang mit der Polyphenoloxydase pflanzlichen Ursprunges die enzymhemmende Wirkung zweier zytostatischer Medikamente abweichender Struktur (Mercaptopurin und Degranol) einerseits auf einem Tyrosin-, andererseits auf einem Brenzkatechin-Substrat untersucht. In jedem Falle stellten wir eine inhibitorische Wirkung mit einer Verschiebung in dieselbe Richtung fest; das heißt, Mercaptopurin hat bei beiden Substraten die katalytische Wirkung der Polyphenoloxydase stärker gehemmt als Degranol.

Auf Grund der stark abweichenden chemischen Zusammensetzung und des strukturellen Aufbaues der Moleküle halten wir den gleichen Wirkungsmechanismus der beiden Medikamente für ausgeschlossen.

In unserer Abhandlung können wir bezüglich des Zusammenhanges zwischen der Wirkung des auf dem Testobjekt (Polyphenoloxydase+Substrat) wahrgenommenen Inhibitors sowie der therapeutischen zytostatischen Wirkung zwar noch keine Stellung einnehmen, doch vertreten wir die Meinung, daß es ein solches Testobjekt zu finden, das die schnelle Auswahl der für die sehr kostspieligen Tierversuche und der diesen folgenden klinischen Untersuchungen entsprechenden Inhibitoren erleichtern könnte, möglich sei.

Tabelle III.

= Tyrosin + Polyphenoloxydase + Zytostatikum

1,0	1,2	1,4	1,6	1,8	2,0	3,0	4,0	5,0
0,270	0,240	0,200	0,180	0,170	0,170	0,140	0,120	0,110

SCHRIFTTUM

- Balogh, P. – Frenyó, V. 1967. Cytostaticus szerek hatásának vizsgálata (Prüfungen von zytostatischen Wirkungsstoffen an Pflanzen). Bot. Közlem. **54**: 231.
- Maróti, M. 1967. Die Wirkung des Degranols auf das Wachstum von isolierten Kallusgeweben. Rev. Roum. Biol. Serie. Botan. **12**: 47.
- Péterfi, I. – Brugovitzky, E. – Kozma, J. – Nagy Tóth, F. 1959. Degranol hatása a növények növekedésére (Wirkung von Degranol auf den Pflanzenwachstum). Biol. közl. Budapest **7**: 39.
- Sábel, L. – Jakab, M. – Sellei, G. 1963. Az élesztő enzytmaktivitása vizsgálatának módszerei (Untersuchungsmethoden der Enzymaktivität der Hefe). Kísér. Orvostud. **15**: 265.
- Schirmacher-Göllner, I. 1964. Kupferenzyme; in: Hoppe-Seiler, Thierfelder: Handbuch der physiologisch- und pathologisch-chemischen Analyse X. Aufl. Bd. VI. A. Springer. Berlin–New York.
- Sellei, C. – Eckhardt, S. – Németh, L. 1968. Daganatos betegségek gyógyszeres kezelése (Medikamentöse Behandlung von Geschwulstkrankheiten). Medicina. Budapest.